

WIEK BADAŃ NAD CHEMOTAKSJĄ PLEMNIKÓW ZWIERZĘCYCH

Leopold Śliwa (Kraków)

Procesy reprodukcyjne mające na celu uzyskiwanie potomstwa, a tym samym przedłużanie sztafety życia o następne pokolenia, od zawsze budziły duże zainteresowanie i chęć wyjaśnienia ich najdrobniejszych szczegółów. Jednym z najbardziej tajemniczych aspektów tego zagadnienia jest zapłodnienie, jego przebieg i mechanizmy regulujące i zwiększające efektywność sukcesu reprodukcyjnego. Zachowania i procesy etologiczne zachodzące na poziomie osobników, takie jak zaloty, toki, gody zwierząt czy ludzi są łatwo dostrzegalne, a tym samym dostępne do analizy i badania, jednak procesy zachodzące na poziomie komórek rozrodczych prowadzące do łączenia się plemnika i jaja w zygotę są mniej oczywiste i bardziej tajemnicze, a tym samym mniej znane nie tylko przeciętnemu człowiekowi, ale również



Ryc. 1. Żyjące grupowo na dnie morskim jeżowce (*Echinoidea*), pierwsze obiekty badań nad chemotaksją plemników. Źródło: <https://encryptedb3.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQmeugVXXKXn95NsaAQN1G7038HAH9Z8KQc5aIZIWSbu2jLMXtwV>.

i naukowcom, biologom. O ile zachowania etologiczne ewidentnie czynione są w celu ułatwienia i intensyfikacji połączenia się gamet i przekazania swojego materiału genetycznego potomstwu, o tyle sam proces fuzji gamet nie ma już tak ewidentnych symptomów i przebiegu oraz znaczenia. Aby jedna zapewnić odpowiednią wydajność tego procesu w przyrodzie wytworzyły się mechanizmy ułatwiające nawiązywanie bezpośredniego kontaktu między gametami. Jednym z nich jest zjawisko chemotaksji plemników czyli ich zdolność do rozpoznawania i kierowania się gradientem substancji chemicznych wydzielanych przez komórki jajowe lub obecnych w ich bezpośrednim środowisku.

Pierwsze badania naukowe chemotaksji plemników zwierząt i wiarygodne opisy tego procesu ułatwiającego nawiązanie podczas zapłodnienia kontaktu plemników z komórką jajową przeprowadzono przed ponad 100 laty. Ich autorem był R. F. Lillie badający zapłodnienie modelowych w tym okresie w embriologii organizmów, jakimi były należące do szkarłupni (*Echinodermata*) jeżowce (*Echinoidea*), głównie z gatunku *Arbacia punctulata*. Wyniki swoich badań zachowania się plemników ich sklejanie się, czyli aglutynacji i zmian ruchliwości w kontakcie z tzw. „wodą jajową”, czyli wodą morską, w której wcześniej pozostawały komórki jajowe wydalone przez samice, opublikował w *Science* w 1912 roku w pracy „The production of sperm iso-agglutinin by ova”. Prace te kontynuował w latach następnych, rozwijając koncepcję możliwości chemotaktycznego działania komórek jajowych na plemniki, a uogólnioną teorię przedstawił w książce omawiającej różne znane w tym czasie aspekty zapłodnienia pod tytułem „Problems of Fertilization” wydanej w 1919 roku przez University of Chicago Press. Od tego momentu właśnie jeżowce, morskie organizmy o zewnętrznym sposobie zapłodnienia, stały się podstawowym modelowym obiektem badań nad zjawiskiem chemotaksji. Trudne badania innych zwierząt, a zwłaszcza ssaków i człowieka, zaczęto prowadzić na szerszą skalę znacznie później, bo dopiero w połowie XX wieku.

Jak wskazują wyniki obserwacji dokonanych w okresie upływających 100 lat od odkrycia, chemotaksja plemników która, jak się wydawało pierwotnie, ograniczała się do roślin i zwierząt niższych, jest powszechnym procesem biologicznym w trakcie zapłodnienia. Początkowo badania dotyczyły tego aspektu reprodukcji jedynie u zwierząt wodnych, prymitywnych morskich jamochłonów (*Coelenterata*), stułbiopławów (*Hydrozoa*). W latach siedemdziesiątych XX wieku Miller wraz z zespołem przebadł ponad 30 gatunków, stwierdzając u większości chemotaksję i jednocześnie określając charakter cząsteczek chemotaktycznych i różnice w budowie pomiędzy gatunkami z różnych grup systematycznych. Cząsteczki te określono jako termostabilne białka o różnej masie cząsteczkowej. Przykładowo u *Anthomedusae* oraz *Limnomedusae* i *Trachymedusae* mają one masę około 5000 D, a *Leptomedusae* jedynie 100 D.

Chemoatraktanty tych zwierząt, obok znaczenia w rozmnażaniu, wydają się pełnić również rolę czynników systematycznych różnicujących gatunki. I tak w przypadku identycznych morfologicznie gatunków *Sarsia tubulosa* i *S. princeps* są one różne i zapobiegają krzyżowemu zapłodnieniu pomiędzy współwystępującymi w środowisku osobnikami. Obok jamochłonów chemotaksję potwierdzono u innych organizmów morskich. Chemotaktyczne białko wyizolowano u rurkopławów (Siphonophora), między innymi u gatunku *Hippopodius hippopus* jest nim termostabilna cząsteczka o masie 25 kD, przy czym w obrębie tej grupy chemoatraktanty nie wykazują swoistości gatunkowej.

Białka mogące oddziaływać na swobodnie pływające plemniki i decydujące o zmianie ich kierunku poruszania się i kierowaniu gradientem stężenia, wyizolowano w drugiej połowie XX wieku z galaretowatych osłonek komórek jajowych jeżowców. Obok poznania masy cząsteczkowej, wynoszącej około 70 kD, udało się również ustalić ich sekwencję aminokwasów. W przypadku gatunków *Strangylocentropus purpuratus* i *Hemicentropus pulcherrinus* nazwano je roboczo speract, a w przypadku *Arbaci punctulata* resact. Oba badane białka są gatunkowo swoiste i działając w naturze na plemniki znajdujące się w okolicy komórek jajowych, decydują o swoistości gatunkowej zapłodnienia zapobiegając krzyżowaniu się gamet różnych gatunków i powstawaniu osobników hybrydowych.

Chemotaktyczne strategie reprodukcyjne zaobserwowano również u morskich osłonic (Protochordata; Urochordata) gatunków *Cionia intestinalis* i *Stiela plicata* oraz *S. clava*. Podczas eksperymentów prowadzonych w warunkach *in vitro* zaobserwowano gromadzenie się plemników tych zwierząt w okolicy końca pipety napełnionej ekstraktem z osłonek jajowych. Chemoatraktanty w tych przypadkach, choć generalnie swoiste gatunkowo, mogą słabo oddziaływać w przypadku prób krzyżowego zapłodnienia. Równocześnie ekstrakty z jaj jamochłonów, np. Tubularia (Hydrozoa), w najmniejszym stopniu nie mają zdolności do zmiany kierunku ruchu plemników gatunków z rodzaju *Stiela*. Podobne zmiany w zachowaniu się plemników pod wpływem komórek jajowych stwierdzono u *Oikopleura dioica* (Urochordata; Larvacea), u tego gatunku chemotaksja i kierowanie się plemników gradientem substancji z osłonek komórek jajowych jest zależne od wyjściowego stężenia w momencie formowania się jej gradientu.

Ten krótki przegląd morskich bezkręgowców nie wyczerpuje listy gatunków wykorzystujących w reprodukcji działania chemotaktyczne. W rzeczywistości

takich gatunków jest znacznie więcej, gdyż corocznie opisuje się szczegóły rozmnażania się nowych gatunków. Obserwacje, głównie z zakresu embriologii, wskazują na możliwość występowania chemotaksji plemników również u bezkręgowców lądowych reprezentujących zapłodnienie wewnętrzne. Przykładowo, tam gdzie występują bogate w żółtko jaja polilecycalne okryte dodatkowo mocnymi i nieprzenikliwymi osłonkami, wnikanie plemników do ich cytoplazmy odbywa się jedynie przez specjalne, obecne w osłonkach otworki, mikropyle. Problemem dla plemników staje się precyzyjne ich odszukanie i przeniknięcie. Mechanizmy kierujące takim zachowaniem nie są jeszcze dostatecznie poznane i można się spodziewać, że badania w tym kierunku dostarczą dalszych faktów potwierdzających hipotezę o powszechności chemotaksji plemników bezkręgowców.

W tym miejscu pojawia się pytanie o chemotaktyczne zachowania plemników kręgowców. Chociaż badania porównawcze zjawiska chemotaksji plemników wśród kręgowców nie były prowadzone na szerszą skalę to, jak podpowiada to intuicja biologa, zjawisko to powinno występować u zwierząt wodnych, szczególnie charakteryzujących się zapłodnieniem zewnętrznym. Znalazło to potwierdzenie w badaniach reprodukcji wybranych gatunków ryb, których jaja otoczone są grubymi osłonkami, a plemniki docierają do oolemy jedynie przez nieliczne kanały mikropylarne. Wielokrotnie, między innymi u rekinów i płaszczyk, zaobserwowano atrakcyjność dla plemników tych miejsc i gromadzenie się gamet męskich w pobliżu otworów w osłonkach przy jednoczesnym przyspieszaniu ruchliwości po wnikięciu do wnętrza kanału mikropylarnego. Sytuacja ulega odwróceniu i plemniki nie kierują się położeniem otworków po zapłodnieniu. Poza rybami chrzęstnoszkieletowymi takie celowe, chemotaktyczne zachowania plemników występuje również u troci (*Salmo trutta*) i jesiotra (*Acipenser sturio*). Chemoatraktanty stwierdzono i opisano, charakteryzując je jako drobnocząsteczkowe, termostabilne peptydy również u kilku gatunków ryb dorszowatych (Gadidae).

Niestety dane dotyczące płazów są jedynie fragmentaryczne. U kumaków (*Bombina sp.*) zaobserwowano możliwość zmiany kierunku ruchu plemników po wnikięciu w obręb osłonki galaretowatej jaja, w której zaczynają kierować się zawsze prostopadłe do oolemy, czyli starają się dotrzeć do powierzchni jaja najkrótszą drogą. Nieco więcej danych uzyskaniu dla *Xenopus laevis*, gdzie nie tylko potwierdzono chemotaktyczne zachowania plemników w warunkach *in vitro* w odpowiedzi na gradient ekstraktu z galarety osłonki jajowej, ale również poznano budowę chemoatraktanta oraz geny odpowiedzialne za jego syntezę w jajach i przemieszczanie się tej substancji do formujących się galarety

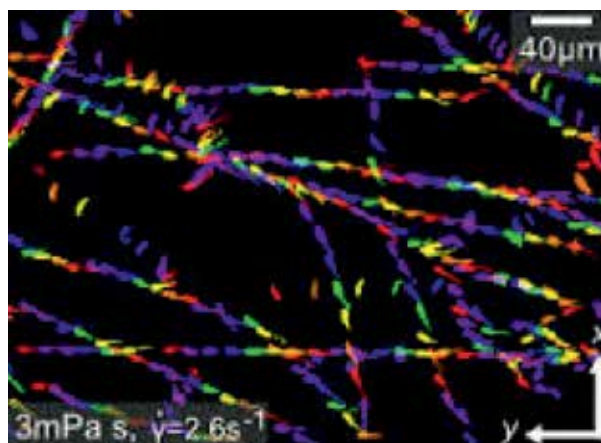
otaczającej oocyty. Substancja ta będąca białkiem o masie 21 kD została roboczo nazwana allurin. Dla lepszego poznania tej grupy systematycznej konieczne są jednak szersze, porównawcze badania podstawowe.

W odniesieniu do gadów i ptaków badania chemotaksji plemników nie były do chwili obecnej prowadzone i nieznane są możliwości zmian w zachowaniu się plemników tych zwierząt w trakcie zapłodnienia.

Assaki? Zjawisko chemotaksji plemników w procesach wewnętrznego zapłodnienia u ssaków było długo kontrowersyjnym problemem badawczym i powątpiewano w jego występowanie. Pierwsze wiarygodne dane nainteresujących nastematopublikował w 1983 roku Dickman badając nieprzypadkowe, jego zdaniem, zachowania plemników królika w jajowodach, w których równocześnie umieszczano do zapłodnienia oocyty. Nietypowe zachowanie, przywabianie plemników, tłumaczył ich chemotaksją przez specyficzne i swoiste gatunkowo cząsteczki obecne w osłonce przejrzystej (*zona pellucida*) owulowanych oocytów. Chociaż wyniki te i ich interpretacja nie były jednoznaczne, to jednak praca rozpoczęła intensywne badania chemotaksji plemników ssaków. Wcześniej, bo już w latach 70. XX wieku, wykazywano w warunkach *in vitro* chemotaktyczne kierowanie się plemników człowieka obecnością niewystępujących naturalnie w układzie rozrodczym substancji, N-formylowanych oligopeptydów (atraktantów ludzkich makrofagów i neutrofilów).

Prowadzone systematyczne badania w warunkach naturalnie panujących w jajowodzie, jak i w pozaustrojowych, zachowania plemników myszy i człowieka potwierdziły naturalne występowanie i znaczenie chemotaksji w zapłodnieniu, jak również poznanie chemoatraktantów plemnikowych obecnych w drogach rodnych. Ostatecznie udowodniono w nich istotne znaczenie płynu pęcherzykowego, zmieniającego po owulacji lokalnie skład chemiczny środowiska bańki jajowodu w okolicy czekającego na zapłodnienie oocyty. Udało się również ustalić znaczenie jednostkowe poszczególnych substancji wchodzących w jego skład. Właściwości chemotaktyczne ma płyn pęcherzykowy pobrany jedynie z prawidłowo rozwiniętych i dojrzałych do owulacji pęcherzyków Graafa. Aspirowany z niedojrzałych lub nieprawidłowych, przykładowo nie zawierających oocyty, nie wpływa w warunkach *in vitro* na ruchliwość i orientację przestrzenną plemników. Ustalono również, że ważne jest jego odpowiednie, najlepiej wysokie i zbliżone do naturalnego w bańce jajowodu, stężenie. Rozcieńczany stopniowo traci rolę chemoatraktanta. Istotna jest również swoistość gatunkowa, a nawet rasowa zwierząt biorących udział w reprodukcji.

Wśród składników płynu pęcherzykowego chemotaktyczne właściwości, obok kwasu hialuronowego, mają obecne w nim hormony. Najsilniejszym chemoatraktantem dla plemników myszy i człowieka jest progesteron, produkowany do płynu pęcherzykowego przez komórki jajnika, jak również po owulacji przez specyficzne komórki steroidogenne obecne w komórkowej, promienistej osłonce (*corona radioata*) owulowanego oocyty. Aktywny wpływ na chemotaktyczne zachowanie plemników mają również inne hormony wchodzące w naturalnych warunkach w skład płynu pęcherzykowego. Można w tym miejscu wymienić estrogeny (sterydy produkowane przez jajniki), jak również oksytocynę, insulinę czy tyroksynę, uważane powszechnie za hormony o somatycznym działaniu obwodowym. Aktywnymi chemoatraktantami okazały się być również inne regulatorowe, bioaktywne w organizmie substancje, takie jak wybrane interleukiny, czynniki wzrostu, a nawet tlenek azotu. Wymienione związki nie wyczerpują listy potencjalnych substancji mogących wpływać na procesy cytofizjologiczne i zachowanie się plemników, gdyż prowadzone badania cały czas dostarczają nowych danych i informacji.



Ryc. 2. Wykonany techniką zdjęć poklatkowych obraz chemotaktycznego poruszania się plemników. Źródło: <https://encrypted-tbn3.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcTvLP7w3ThSgD3e1Gq8s7obhdcXwFARNhcdsQ1cteHzG-y2zL0hQ>.

Przedstawiony zarys ponad wieku badań nad zjawiskiem chemotaksji plemników nie wyczerpuje całości tego szerokiego zagadnienia. Ograniczono się w nim do danych systematycznych i porównawczych, z konieczności pomijając procesy i mechanizmy działające w komórkach plemnikowych, decydujące o modyfikacji ich metabolizmu, jak również kierujące ruchem komórek. Te aspekty chemotaksji plemników, w przypadku zainteresowania czytelników, zostaną opisane w kolejnym artykule.